

고지방식이 유도 비만 흰쥐의 뇌 시상하부 비만 관련 인자에 대한 차전자와 복령의 복합 물추출물의 효과

황정수¹, 석장미^{1,2}, 최혜민^{1,2}, 신인순^{1,2}, 황수정^{1,2}, 박지영^{1,2}, 김성옥^{1,2}, 서부일¹, 김미려^{1,2,3*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

2 : 대구한의대학교 BK21 한방신약개발연구팀

3 : (재)대구TP 한방산업지원센터

Effects of CJB Water Extract on Obesity-Related Factors in Hypothalamus of Rats Fed High-Fat Diet

Jeong Soo Hwang¹, Jang Mi Suk^{1,2}, Hye min Choi^{1,2}, Insoon Shin^{1,2}, Su Jung Hwang^{1,2},
Ji Young Park^{1,2}, Sung OK Kim^{1,2}, Bu Il Seo¹, Mi Ryeo Kim^{1,2,3*}

1 : Department of Herbal Pharmacology, Daegu Haany University, Korea

2 : R&D Team for the New Drug of Oriental Medicine (BK21), Daegu Haany University, Korea

3 : Daegu Technopark Oriental Medicine Industry Support Center, Daegu, Korea.

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to investigate the anti-obesity effects of mixed water extract of Plantaginis Semen & Poria (CJB) on obese rats induced with high fat diet.

Method: Male Sprague-Dawley rats were divided into three groups; Normal group, high-fat (HF) group, HF+CJB(100 mg/kg, P.O.) for 8 weeks. The body weight, food intake and weights of adipose tissues were measured, respectively. Lipid profiles in serum were analyzed by automatic analyzer of blood. Obese marker proteins and the changes of NPY and LR immunoreactivities in hypothalamus were analyzed by Western blot and immunohistochemistry.

Results : CJB significantly reduced body weight, food intake, adipose tissue weights compared to HF group. Serum triglyceride and total cholesterol were significantly higher in HF group than in Normal group however, CJB significantly lowered those of HF group. HDL-cholesterol level in CJB groups was elevated compared to HF group. The pAMPK in hypothalamus were decreased in that of HF group and that of CJB group decreased. Inversely, ACC was increased in HF group and that of CJB groups decrease. Expression of PPAR γ in hypothalamus was increased by CJB treatment. However, PPAR α levels in CJB group were decreased compared to HF group. The expressions of NPY and LR in PVN and ARC of hypothalamus were decreased in CJB group, respectively.

Conclusion : Administration of CJB can play anti-obesity through regulations of NPY and LR activities and obesity marker proteins in obese rat's hypothalamus.

Key words : Mixed water extract of Plantaginis Semen & Poria (CJB), high fat diet, lipid profiles, hypothalamus, anti-obesity

서론

세계보건기구(WHO, World Health Organization)의 최근 통계에 따르면 전 세계적으로 과체중과 비만으로 매년 성인

*교신저자 : 김미려, 대구광역시 수성구 상동 165번지 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, (재)대구테크노파크 한방산업지원센터
· Tel : +82-53-770-2241 · Fax : +82-53-770-2241 · E-mail : mrkim@dhu.ac.kr
· 접수 : 2012년 08월 09일 · 수정 : 2012년 08월 31일 · 채택 : 2012년 09월 05일

280만 명이 사망하고 있는 글로벌 사망률 5위이며 전 세계 성인 열 명 중 한 명 이상은 비만이라고 하였다¹⁾. 2011년 발표된 1998~2008년 국민건강영양조사 통계자료에 따르면 지난 10년 동안 체질량지수(BMI, Body Mass Index, kg/m²) 25이상인 성인 남녀 비만 유병율은 1998년 26.0%, 2001년 29.2%, 2005년 31.3%, 2007년 31.7%, 2008년 30.7%로 거의 지속적인 증가추세를 보이고 있다. 이러한 비만의 높은 증가율은 고혈압, 당뇨병, 심혈관 질환 등의 만성퇴행성 질환의 발병을 증가시킬²⁾ 뿐만 아니라, 우리나라 국민의 비만과 관련하여 지출되는 사회·경제적 비용 또한 기하급수적으로 증가될 것으로 예상되고 있다³⁾.

비만예방 및 치료에 대한 서양의학적인 약물 요법으로 식욕억제제인 sibutramine, 지방흡수 억제제인 orlistat, 식욕 및 지방합성 억제 효과가 있는 rimonabant 등을 포함한 몇몇 약제가 미국 FDA승인을 받아 비만 치료에 이용되고 있지만 많은 부작용과 임상에서의 낮은 효능, 적용 환자의 제한 등⁴⁾의 한계점을 가지고 있어서, 이것을 극복하면서 항비만효능 및 안전성이 입증된 새로운 대체약물의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다.

비만은 한의학적으로 오장육부의 조화로운 기능의 상실로 濕痰이 비정상적으로 인체 내에 축적된 상태를 말하며⁵⁾, 최근 한약의 비만치료에 대한 연구는 방풍통성산이나 오령산 등 기존의 복합처방연구나 일부 단미제에 대한 연구⁶⁾에서 유의한 결과가 보고되긴 하였으나, 임상뿐만 아니라 비만 예방 및 치료 보조제품으로 장기간 복용하거나 시장에서 활용되기에는 여전히 어려움이 많다.

차전자(車前子, Plantaginis Semen)는 질경이과(Plantaginaceae)에 속하는 다년생 草本인 차전초(車前草, *Plantago asiatica* L.)의 종자이다. 맛은 달(甘)고, 성질은 약간 차고(微寒), 귀경으로는 간, 신, 폐, 소장경에 작용한다⁷⁾. 효능은 利水通淋, 滲濕止瀉, 清肝明目, 清肺化痰이 있다. Moreno 등은 차전자의 껍질을 식재료에 섞어 공급한 결과 청소년 및 소아비만의 당, 지질 대사조절 및 개선을 보고하였다⁸⁾. 또한 Mrati-Munari 등은 비만과 당뇨병 환자에 *Plantago psyllium*공급으로 혈청지질, 혈당, 체중의 감소를 보고하였다⁹⁾. 그리고 Enzi 등은 비만 환자들에게 차전자의 점액질 성분인 친수성의 mucilage 공급시 체중감소, 혈장 중성지방 감소, 혈장 빌리루빈 감소를 보고하였다¹⁰⁾.

복령(茯苓, *Poria*)은 구멍쟁이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 真菌인 茯苓 (*Poria cocos* Wolf)의 균핵을 건조한 것이다. 맛이 달(甘)고 성질은 평(平)하며 심, 비, 폐로 귀경하며 利水滲濕, 健脾, 寧心安神의 효능⁷⁾이 있으며 부종(edema)^{12,13)} 등에 효과가 있다고 보고된바 있다. 또 다른 보고로 Sato 등은¹¹⁾ 비만 고혈당증 db/db 마우스와 제2형 당뇨병 마우스에 복령에서 추출한 dehydrotrametenolic acid 경구투여시 고혈당증 감소를 보고하였다. 그러나, 차전자와 복령 복합 물추출액의 비만관련 지질개선 및 조직에 미치는 영향에 대한 연구는 아주 미흡하다.

이에 본 연구에서는 利水通淋藥인 차전자와 利水退腫藥인 복령의 복합 물추출물(CJB)의 항비만 효과를 확인하기 위하여 고지방식이 유발 비만 흰쥐에 8주간 CJB를 경구투여하여 체중감소, 혈청 및 조직 내 지질농도, 식욕조절 중추인 뇌 시상하부의 신경내분비인자와 외분비인자에 미치는 영향을 조사

하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB) 조제

실험에 사용된 차전자와 복령은 남경약업사(대구)로부터 영천산을 구입하여 대구한의대 본초학교실에서 감별, 엄선하였으며 증류수로 깨끗하게 세척한 후 이물질을 제거한 다음 실험에 사용하였다. 차전자의 건조 약재 600 g과 복령 600 g의 복합물에 10배의 증류수를 가하고 가온하여 2.5시간 추출한 후 2겹 거어즈와 여과지(Whatman1, USA)로 여과하였다. 수거한 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Japan)로 감압 농축한 후 동결 건조하였으며 CJB 건조물의 수득율은 18.6% 이었다. 동결건조된 약물은 냉동 보관하면서 실험 직전 생리식염수로 녹인 후 적정 농도를 실험동물에 경구투여하였다.

2. 실험동물

실험동물은 오리엔트 바이오(성남, 경기도)에서 분양 받은 체중 160-190 g내외의 5주령 수컷 흰쥐(Sprague Dawley)를 각각 한 cage당 한 마리씩 넣고 온도 22±2℃, 습도 53.3%, 12:12 light-dark cycle로 일반사료(효창사이언스(주))로 일주일 적응시킨후 난괴법으로 3개 실험군으로 나누어 8주간 실험하였다. 물과 실험식은 자율섭식 하도록 하였다.

3. 비만 동물모델 제작을 위한 고지방식이 조제 및 약물 투여

Table 1. Composition of the experimental diets (g)

Ingredients	Normal	HF
Casein	20,00	20,00
DL-Methionine	0,30	0,30
Corn starch	15,00	15,00
Sucrose	50,00	39,75
Cellulose	5,00	5,00
Corn oil	5,00	5,00
Mineral-mix	3,50	3,50
Vitamin-mix	1,00	1,00
Choline bitartrate	0,20	0,20
Lard	-	10,00
Cholesterol	-	0,20
Cholic acid	-	0,05
Total (%)	100	100
Kcal/100g diet	385	434
Calorie from fat(%)	11,7	31,1
Calorie from carbohydrate(%)	67,5	50,5
Calorie from protein (%)	20,8	18,4

탄수화물이 주식인 한국인의 식습관에 따라 15% (lard-10% w/w, corn oil-5% w/w)함유의 고지방 식이로, 기존 고지방식에서 지방의 열량을 약 30% 줄이고, 탄수화물의 열량을 50% 높여 조제하였다(Table 1). 실험군은 그룹 당 15마리씩 3그룹으로 나누었고, 정상식이군(Normal)에게는 일반식이(AIN-76), 고지방식이군(HF)은 고지방 식이와 생리식염수를 먹였다. 실험군에는 고지방식이와 차전자와 복령의 물추출물(CJB)을 100 mg/kg씩 1일 1회 경구투여하여 8주간 사육하였다. 식이섭취량은 매일 일정한 시간에 측정하였고, 체

증은 일주일에 한 번씩 측정하여 식이효율(food efficiency ratio: FER)을 구하였다. 식이효율은 8주 전 실험 시작일의 체중에서 8주 후 실험 종료일까지의 체중 차를 8주 기간 동안의 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

4. 장기무게 측정 및 조직 분리

실험동물을 12시간 동안 절식시키고 에테르를 흡입시켜 마취시킨 다음, 복부 하대정맥으로부터 EDTA가 처리된 튜브를 이용하여 혈액을 채취한 후 3000 rpm (4℃)에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 실험동물로부터 혈액을 수집하고, 지방 조직(부고환지방, 신장주위지방, 복막 후 복부 피하지방)을 즉시 적출하여 차가운 생리식염수에 수차례 세척하여 표면의 수분을 제거한 후 칭량하였다. 면역조직화학 분석을 위한 뇌 조직은 4% paraformaldehyde 용액으로 관류 고정하여 보관액에 넣어 냉장 보관하였으며, 단백질 발현분석을 위한 뇌조직은 조직 적출 후 즉시 액체질소로 급냉시켜 실험 분석 전까지 -80℃에 보관하였다.

5. 혈액 분석

혈액으로부터 분리한 혈장에서 총콜레스테롤(total cholesterol, TC; Diya Chemical, Japan), 중성지질(triglyceride, TG; Eiken Chemical Co. Ltd, Japan), 고밀도지단백질 콜레스테롤(High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)와 저밀도지단백질 콜레스테롤(Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)을 자동혈액분석기(Hitachi 7180, Japan)를 사용하여 분석하였다.

6. 뇌 시상하부에서 AMPK, ACC, PPAR γ , PPAR α 단백질의 발현 측정

흰쥐로부터 분리한 뇌 시상하부 조직을 lysis buffer (137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 10% glycerol, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 35 μ M benzamide, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF)를 사용하여 균질화 시킨 다음 4℃, 14,000Xg에서 10분간 원심분리하여 상등액을 수집하였다. 분리된 단백질의 농도를 BCA reagent (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 정량한 뒤, 50 μ g 단백을 8%~12% SDS-PAGE에서 전기영동 시켰다. Gel에 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, 0.45 mm, Millipore, USA)에 transfer한 후 5% bovine serum albumin (BSA)-TBST (TBS, 0.1% Tween-20)로 실온에서 30분 동안 blocking 시켜 acetyl-CoA carboxylase (ACC), phospho-ACC, AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMPK, Peroxisome proliferators-activator receptor- α (PPAR α), PPAR γ , β -actin (1:1000 dilution, CellSignaling, USA) 알맞은 1차항체를 각각 membrane에 반응시킨 후 이를 적절히 2차 항체 (goat anti-rabbit-HRP, 1:5000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, USA)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이후 ECL reagent (Amersham Pharmacia Biotech.,

USA)를 사용하여 1분간 반응시킨 후 Image Quant software (Buckinghamshire, UK)를 사용하여 membrane에 부착된 타겟 단백질을 확인하였다.

7. 뇌 시상하부에서의 neuropeptide Y (NPY) 및 Leptin receptor (LR)의 발현 측정

실험 동물을 sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p., Hanlim Pharm, Co., LTD, Korea)로 전신마취 후 흉강을 열고 4% paraformaldehyde용액(pH 7.4)으로 좌심실을 통하여 전신 관류하여 뇌 조직을 적출하였다. 적출된 뇌 조직은 20% sucrose (0.1 M phosphate buffer saline, PBS (pH 7.4)용액에 가라앉힌 다음 10시간 이상 고정 시킨 후 optimal cutting temperature compound (Sakura, USA)로 embedding하여 블록으로 만들고 냉동박절기(Leica, CM1850-7-1, Germany)으로 30 μ m 두께의 광상단면 연속절편을 제작하였다. NPY에 대한 1차 항체 (Abcam Cambridge Science Park, UK)와 LR에 대한 1차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 각각 72시간 동안 4℃에서 반응 시켰다. 이를 다시 PBST로 세척한 다음 2차 항체인 Biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, USA)와 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이를 ABC kit (Vector Laboratories, USA)를 이용해서 발색시킨 후 DAB reagent buffer (Vector Laboratories, USA) 염색하였다. 연이어 에탄올로 탈수 하고 permount solution (Fisher Scientific, USA) 으로 cover 슬라이드를 씌운 다음, 광학현미경(Nikon ECLIPSE 80i, Japan)으로 관찰하였다.

8. 통계 분석

본 연구의 모든 실험 결과는 SPSS 프로그램(Version 11)을 이용하여 정상군과 실험군의 평균과 평균오차(mean \pm SE)로 표시하였고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 일원배치 ANOVA를 통해 분석하였으며, 각 군간의 차이는 p<0.05 수준에서 least significant difference (LSD) post-hoc tests로 사후 검정하였다.

결 과

1. 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB)이 체중 변화에 미치는 영향

CJB 경구투여가 고지방식으로 비만이 유발된 흰쥐에서의 체중증가에 미치는 영향을 조사하였다. 모든 실험군간 실험 개시일의 체중은 248.25 ~ 250.90 g으로 유의적 차이를 보이지 않았으나, 식이시작 3주후 부터 HF군은 Normal군과 CJB군에 비해 유의적인 체중 증가를 나타내었다. 반면 Normal군과 CJB군은 HF군에 비해 유의적(p<0.05)인 체중 감소를 나타내기 시작하였으며, 실험종료 8주까지 같은 경향을 나타내었고, 실험종료 후 CJB군에서 HF군에 비해 유의적(p<0.05)인 체중 감소를 나타내었다. 따라서 CJB 경구투여는 고지방식으로 유발된 비만 흰쥐의 체중증가를 유의적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 이는 Normal군보다도 더 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

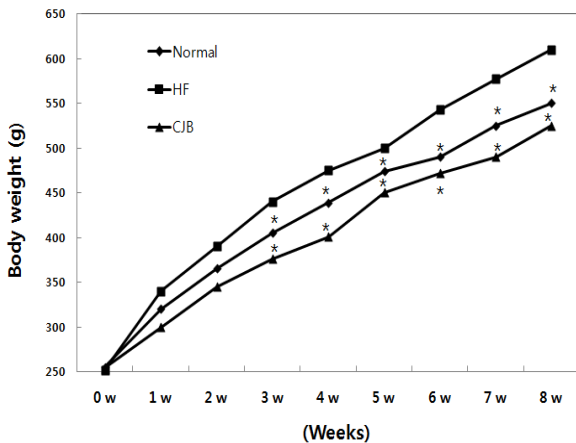


Fig.1. Effects of the CJB water extract on body weight changes in rats fed high-fat diet. The values are mean±SE of 8 animals, * : Significantly different from Normal and CJB groups compared with HF group (p<0.05), respectively.

2. 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB)이 식이 섭취량 체중증가량 및 식이효율에 미치는 영향

CJB 경구투여가 고지방식으로 유발된 비만 흰쥐에서 식이 섭취량, 체중증가량, 식이 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 식이섭취량은 Normal군에 비해 CJB군에서 유의하게(p<0.05)감소하였다. 한편, 정상군에 비해 HF군에서는 식이섭취량이 감소하는 경향을 보였으나, 식이효율은 HF에서 가장 높았다. 체중증가량의 변화는 HF군에 비해 CJB군에서 감소하였고, Normal군에 비해 HF군에서 유의한(p<0.05) 증가를 나타내었다. 또한, 식이효율(FER)은 HF, CJB, Normal 군 순서로 감소하였다(Table 2).

Table 2. Effects of the CJB water extract on food intake, weight gain and FER in rats fed high-fat diet.

	Normal	HF	CJB
Food intake (g/day)	28.30±1.06	26.43±0.91	24.38±0.71*
Weight gain (g/day)	5.75±0.21	6.32±0.34*	5.41±0.20
FER	0.19±0.01	0.24±0.01	0.22±0.01

The values are mean±SE of 8 rats per group. HF: fed high-fat diet group, CJB: fed high-fat diet with 100 mg/kg CJB group, FER (Food Efficiency Ratio) = body weight gain / food intake. * : Significantly different from HF group (p<0.05).

3. 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB)이 지방 조직 무게 변화에 미치는 영향

8주 동안 고지방식으로 비만이 유발된 흰쥐에서 CJB 경구 투여가 체중 100 g당 지방조직에 미치는 영향에 대해 조사하여 Fig. 2에 나타내었다. CJB군은 9.89±0.39 g으로 HF군에 비해 부고환지방의 무게가 유의하게(p<0.05) 감소하였으며, Normal군과는 유의적인 차이를 보이지 않았다. HF군의 부고환 지방 무게가 16.08±1.31 g으로 Normal군의 8.25±0.59 g에 비해 유의적(p<0.05)인 증가를 나타내었다. 한편, 신장주위 지방조직의 무게는 HF군에 비해 CJB군(13.5±1.07 g)에서 유의한(p<0.05)감소를 나타내었으며,

HF군(22.67±1.04 g)이 Normal군(9.19±0.9 g)에 비해 유의적(p<0.05)인 증가를 나타내었다. 각 실험군의 내장 지방무게 변화 역시 신장주위 지방무게 변화와 유사하게 HF, CJB, Normal군의 순서로 유의적(p<0.05)인 감소를 나타내었다. 갈색 지방조직의 무게는 Normal군(0.29±0.04 g)과 HF군(0.46±0.02 g)에 비해 CJB군(0.37±0.03 g)에서 유의적인 감소를 나타내었다.

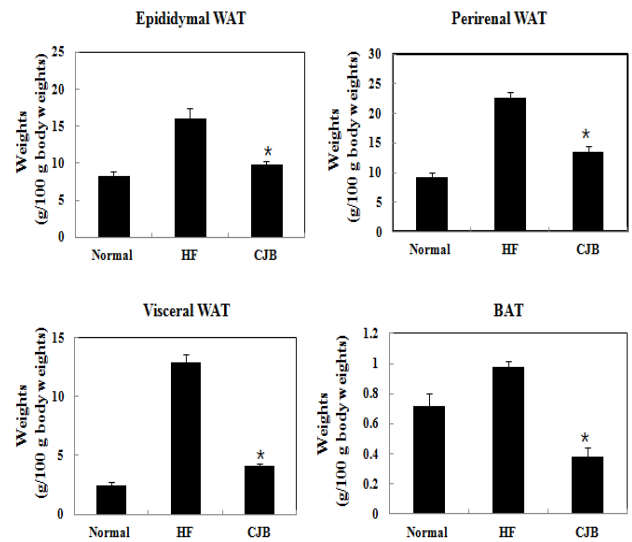


Fig.2. Effects of the CJB water extract on weights of adipose tissues in rats fed high-fat diet. The values are mean±SE of 7 animals. WAT: white adipose tissue; BAT: brown adipose tissue. * : Significantly different from HF group (p<0.05).

4. 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB)이 혈청 지질 농도의 변화에 미치는 영향

CJB 경구투여가 고지방식이 유도 비만 흰쥐의 체지방 농도에 미치는 영향을 알아 보기 위해 혈청 내 총콜레스테롤, 중성지방, 포도당, 지단백질 함량을 각각 분석하여 Fig. 3에 나타내었다. 먼저, 총 콜레스테롤의 함량은 CJB군에서 74.28±6.09 mg/dl로 측정되어 HF군에서 103.40±7.22 mg/dl 보다 유의적으로(p<0.05)감소하였다. 중성지방 농도는 CJB 투여군(32.85±5.11 mg/dl)에서 HF군에 비해 3.4배의 유의한(p<0.05)감소를 나타냄으로써 Normal군과 유사하게 변화하였으며, HF군(111.60±18.84 mg/dl)에서는 Normal군(20.28±2.85 mg/dl)에 비해 5.5배의 유의적인(p<0.05)증가를 나타내었다. 혈청 HDL-C 농도는 HF군(15.58±0.79 mg/dl)에 비해 CJB군(21.52±2.29 mg/dl)에서 증가하였으며 HF군은 Normal군(34.50±1.25 mg/dl)에 비해 2.2배의 유의한(p<0.05)감소를 나타내었다. 반면, 혈청 LDL-C 농도는 HF군(20.20±2.1 mg/dl)에 비해 CJB군(12.88±2.71 mg/dl)에서 1.7배 감소를 나타내었고, HF군은 Normal군(6.08±0.581 mg/dl)보다 3.3배의 유의적인(p<0.05)증가를 나타내었다.

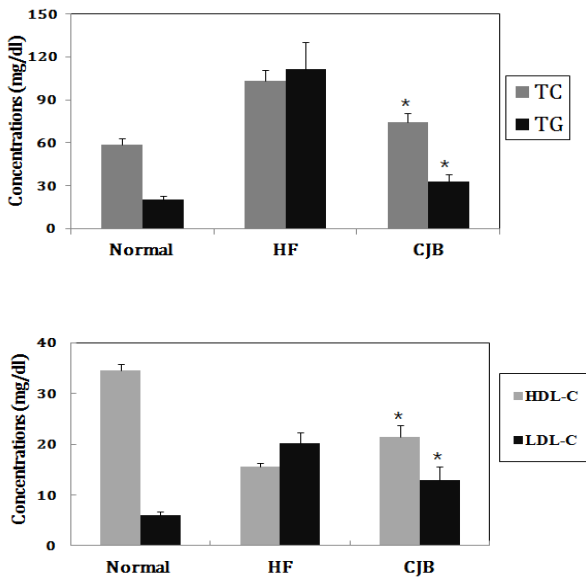


Fig.3. Effects of the CJB water extract on serum lipid profiles in rats fed high-fat diet. Mean±S.E of 7 animals. * : Significantly different in HF group vs CJB group (p<0.05). NS: no significance. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C).

5. 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB)이 뇌 시상하부에서 AMPK, ACC, PPAR γ 와 PPAR α 단백질 발현에 미치는 영향

CJB 경구투여가 8주간의 고지방식으로 비만이 유발된 흰쥐의 시상하부(hypothalamus) 조직에서의 비만관련 지표로 에너지와 지질 대사에 각각 관련된 단백질인 AMPK, ACC, PPAR γ 와 PPAR α 의 발현에 대한 영향을 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. 먼저, 세포대사와 에너지 균형을 조절하는 것으로 알려진 AMPK 효소의 활성을 측정하기 위해 AMPK인산화 수준을 조사한 결과 CJB군에서 HF군에 비해 AMPK발현이 더 감소하였으며, Normal군의 시상하부 조직에 비해 HF군에서 AMPK단백질의 인산화 수준이 감소하였다. 지방산 대사에 중요한 역할을 하는 ACC 단백질의 인산화 수준을 조사한 결과, HF군에 비해CJB군에서 감소되었고, Normal군에 비해 HF군에서 ACC 인산화가 증가하였다. 한편, 지방산 산화조절 단백질인 PPAR α 는 Normal군에 비해 CJB군에서 유의적으로(p<0.05)감소하였으며, HF군에서 감소하는 경향을 보였다. 반면, 지방세포 형성의 주요 조절 단백질인 PPAR γ 의 발현수준은 Normal군에 비해 CJB군에서 유의적으로(p<0.05)증가하였으나, HF군에서 감소하였다(Fig. 4).

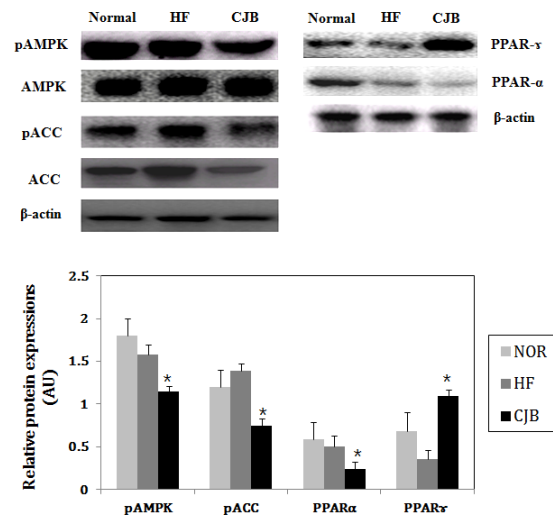


Fig.4. Effects of the CJB water extract on expressions of obesity marker proteins of the hypothalamus in rats fed high-fat diet. (n=3) * : Significantly different from HF group vs CJB group (p<0.05).

6. 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB)이 뇌 시상하부의 PVN 영역에서의 NPY 발현에 미치는 영향

고지방식으로 유발된 비만 흰쥐의 뇌조직에서 식욕과 식이 섭취 조절에 대한 CJB 영향을 조사하기 위해 식욕조절 중추인 뇌 시상하부의 방실핵(paraventricular nucleus, PVN)영역을 면역조직화학 하여 관찰한 결과, 체중조절에 관여하는 신경전달 물질인 NPY의 발현은 CJB군이 HF군에 비해 유의적으로(p<0.05)감소되었으며, Normal군에 비해 HF군에서는 증가되었다(Fig. 5).

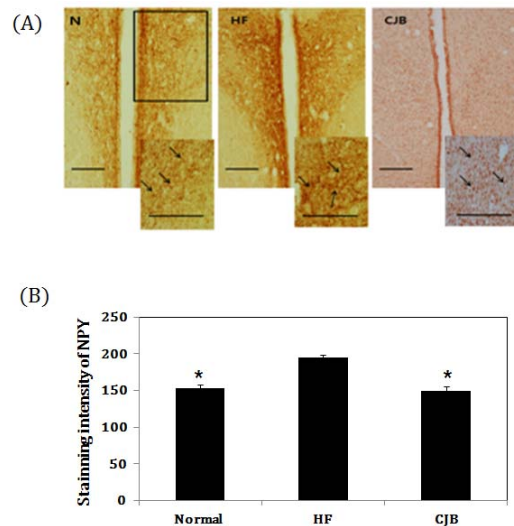


Fig.5. Effects of the CJB water extract on neuropeptide Y immunoreactivity in PVN inratsfed high - fat diet. (A) The density of NPY immunoreactivity with a 500 X 500 μ m grid at 100 magnification. Scale bar represents 100 μ m and 400 μ m; (B) Data are presented as mean±SE (n=8 for each group). They were compared using the ANOVA and post-LSD test (* p<0.05 vs HF).

7. 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB)이 뇌 시상하부의 ARC 영역에서의 LR 발현에 미치는 영향

고지방식이 공급으로 유발된 비만 흰쥐의 뇌조직에 대한 CJB의 영향을 조사하기 위해서 말초의 지방조직에서 분비되는 렙틴 등의 물질에 영향을 받는 신경내분비계 영역인 렙틴 수용체(LR)가 존재하는 뇌 시상하부의 신경세포 집합체인 궁상핵(arcuate nucleus, ARC)에서의 렙틴수용체 발현을 관찰하기 위해 면역조직화학을 수행하였다. 그 결과, CJB 경구투여로 HF군에 비해 유의적으로(p<0.05)감소하였으며, Normal군에 비해 HF군에서 LR의 발현이 증가되는 것을 관찰하였다 (Fig. 6).

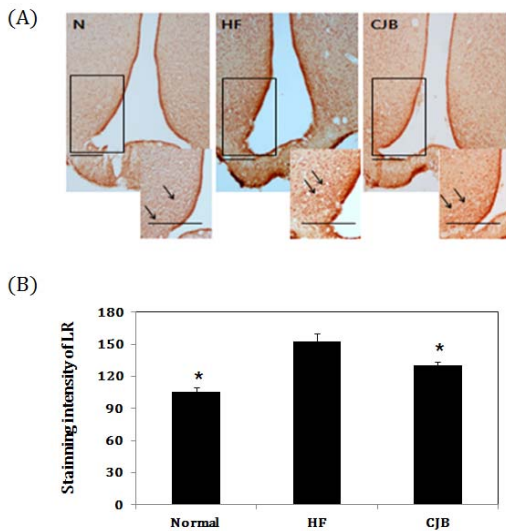


Fig.6. Effects of the CJB water extract on leptin receptor immunoreactivity in the ARC in rats fed high-fat diet. (A) The density of LR immunoreactivity with a 500 X 500 μm grid at 100 magnification. Scale bar represents 100 μm and 400 μm. (B) Data are presented as mean±SE (n=8 for each group). They were compared using the ANOVA and post-LSD test (* p<0.05 vs HF).

고찰

비만은 심리적으로나 사회적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라, 불안, 우울증 등을 나타내기도 하고, 고콜레스테롤혈증, 지방간, 동맥경화증, 고혈압, 뇌졸중, 당뇨병, 심혈관질환 등 성인병의 유발을 증가 시키는 것으로 알려져 있다¹⁻³). 따라서 전 세계적으로 국민보건과 건강을 위해 비만 치료 약물의 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 비만 치료제의 대부분은 여전히 임상에서 심각한 부작용을 동반하는 경우가 많으며 그 효과가 미미한 것으로 나타나고 있다. 따라서 한국인에 맞는 multitarget을 가진 안전하고 효능이 뛰어난 새로운 약제의 개발이 절실한 상태이다. 따라서 저자는 고열량 섭취로 인한 서구형 비만과 탄수화물 위주의 한국인 식습관에 의한 비만은 그 치료에서 차이가 있으므로, 부작용이 상대적으로 낮고 오랜 세월 그 효능이 검증된 한약재를 활용함으로 한국인의 체질에 맞는 항비만 소재 개발과 그 작용기전을 밝히는 연구가 중요하다고 사료되어 본 연구를 수행하였다.

한의학에서 비만은 한의학적으로 인체에 불필요한 濕痰이

체내에 오래 정체되어 과다하게 축적되어 있는 상태를 말한다.¹⁴⁾

한의학에서 차전자는 性味が 甘하고 寒하며 歸經으로 肝, 腎, 肺, 小腸經에 작용하여 清熱利濕藥과 배합한다⁷⁾. 또한 水道를 通利하여 滲濕泄熱시켜 濕熱이 소변을 따라 배출하게 한다.¹⁵⁾ 또한 복령은 性味が 甘하고 淡하며 성질은 平하다. 歸經으로 心, 脾, 肺經에 작용하며, 利水滲濕, 健脾의 효능이 있어 小便不利, 浮腫 등 치료에 사용⁷⁾되며 脾虛로 인한 濕滯나 水腫, 小便不利 및 下利, 痰飲 등의 치료에 항상 사용되므로¹⁶⁾ 濕痰으로 인한 하체비만일 때에 사용하는 약으로 널리 알려져 있다. 그래서 비만의 병기인 濕痰, 瘀血, 氣滯 등을 다스리는 약재인 차전자와 복령을 동량 복합한 물추출액(CJB)을 사용하여 항비만에 대한 효능 검증을 하고자 하였다.

비만에서 체중 감량은 비만과 관련된 질환과 대사 장애를 호전시키는데¹⁷⁾, 본 연구에서 CJB 경구투여는 고지방식이 비만유도 흰쥐에서 유의적으로 체중감소 효과를 나타내었으며, 식이섭취량을 억제함으로써 일일 에너지 대사량의 감소를 나타내었다. 이는 생화학적 대사 관점에서 볼때 차전자의 점액 성분인 mucilage와 복령의 주성분인 수용성 식이섬유소인 β-glucan에 기인된 결과로 생각된다. Tominaga 등은 β-glucan이 풍부한 음료의 공급이 고지방식이 유도 비만 마우스에서 식이 섭취 억제의 항비만 효과를 보고하였다¹⁸⁾. 한의학 관점에서 본다면 차전자와 복령은 利尿通淋의 대표적 약물로 체내 습 제거로 인한 체중감소 효과를 볼 수 있다. 한편, 고지방식이 유도 비만쥐에 CJB 경구투여는 체중감소 효과 뿐 만 아니라 체지방의 대표적 지표인 부고환 지방의 무게도 고지방식이 HF군에 비하여 유의적으로 감소시켰다. 이는 CJB의 경구투여가 식이섭취량 억제와 함께 체내의 근육량이 아닌 체내 지방 축적의 억제로 체지방조직의 무게를 감소시킴으로써 체중감소 효과를 가져오는 것을 짐작할 수 있다.

비만은 대사증후군의 중요한 인자로서 뇌졸중, 심근경색 및 심혈관 질환 사이에 직접적인 연관성이 있는 것으로 잘 알려져 있다^{1-3,19)}. 따라서 고지방식이 유도 비만쥐에 CJB 경구투여로 인한 혈청 지질 농도변화를 측정된 결과 본 실험에서 CJB 경구투여는 고지방식으로 증가된 혈청 지질 농도를 유의적으로 억제하여 개선하였다. 이러한 혈청 지질 함량의 감소는 관상심혈관 질환의 위험을 감소시키는 것으로 알려져²⁰⁾ 있으므로 과다한 지방 섭취로 인한 혈중지질함량 증가는 CJB섭취에 의해 개선 될 수 있을 것으로 사료된다.

HDL-콜레스테롤은 말초조직으로부터 콜레스테롤을 간으로 수송하는 항동맥경화 지표로서 고지방식을 공급한 비만유도 흰쥐에서 CJB 경구투여는 총콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율(HTR)을 높임으로써 고지혈증을 가진 환자의 심혈관 질환의 예방에 유효할 것으로 사료된다. 이러한 효과 역시 시료에 포함된 수용성 식이섬유의 고콜레스테롤혈증 개선 효과²¹⁻²³⁾와 차전자에 함유되어 있는 다양한 길이의 사슬로 이루어진 복잡하고 가지가 있는 글루칸인 mucilage, 수용성 식이섬유소인 β-glucan을, 건조 무게당 93% 함유한 복령의 복합적인 효과로 보여지며, 혈중 지방 저하²⁴⁾, 장관 통과 시 지방흡수 조절²⁵⁾ 등의 효능 보고와도 일치하므로 CJB 물추출액 복용 시 혈중 지질 개선 및 고지혈증 예방에도 효과적일 것으로 생각된다. 한편 기²⁶⁾ 등은 고지방식이 유도 비만 흰쥐의 고지혈증에서 방기복령탕-2를 복용한 후 총 콜레스테

를, 중성지방 함량이 저하되었다고 보고 하였으며, 이러한 결과는 본 실험결과와 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

AMPK는 serine/threonine kinase의 일원으로 세포 내 에너지 상태를 감지하는 효소로서²⁷⁾, 세포 내 에너지가 부족한 상황에서 활성화되어 정상 에너지 균형을 회복시키기 위해 ATP를 소비하는 과정 즉 지방산, 콜레스테롤 등의 합성을 억제하고, ATP를 생산하는 과정 즉 지방산 산화, 해당과정을 활성화 시킨다²⁸⁾. 또한 AMPK는 지방세포로부터 분비되는 렙틴(leptin)과 아디포넥틴(adiponectin)의 세포 내 신호전달 물질로도 잘 알려져 있다²⁹⁻³⁰⁾. ACC는 지방대사가 증가할 경우에 생성되는 효소 물질로서³¹⁾, AMPK에 의한 지방산 합성에서 ACC 등 핵심 효소를 억제함으로써 ATP의 추가적 사용을 제한하게 된다³²⁾. 여러 연구에서 지방조직이나 또는 근육조직에서 비만 관련 지표단백질의 발현 변화를 비교³³⁻³⁴⁾ 하고 있으나 식이 및 체중 조절의 중추적 조절기능을 담당하는 시상하부에서의 AMPK, ACC 등의 단백질 발현에 대한 연구는 상대적으로 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 고지방식이 유도 비만 흰쥐의 뇌 시상하부조직에서 비만 및 에너지 대사의 표적 단백질인 AMPK와 ACC의 활성 및 지방합성 및 분해 관련 대표단백질인 PPAR- γ 와 PPAR α 의 활성을 측정하였으며 CJB 경구투여는 고지방식이에 따른 AMPK의 인산화와 ACC의 인산화를 모두 현저히 억제하였다. 이 결과로부터 CJB 경구투여는 근육에서의 특성과는 다르게 뇌에서 leptin과 관련된 LR의 저항성을 낮춤으로써 지방대사를 개선시키는 것으로 특히 AMPK경로를 통한 지방축적 억제 기전이 아닌 다른 기전을 통해서 체지방 축적을 억제시키는 것으로 추정된다. PPARs는 다양한 호르몬에 대한 핵 수용체군의 하나로서 지방세포의 분화를 조절하는 전사효소로 알려져 있으며, α , γ , β/δ 세 아형이 보고되고 있다. 이러한 이성체들은 서로 간의 통합적 기능을 수행하거나 각각의 고유한 특징적 기능을 발휘함으로써 지방조직 내 지질 전달이나, 섭취, 지방산 산화 등에 관여하는 단백질들의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다³⁵⁾. 특히 PPAR- γ 의 활성화는 간과 지방조직에서 세포분화 lipogenesis에 관여함으로써 지질을 저장하는데 특히 지방조직에서는 adipogenesis, adipokine production에 관여하여, 지방산을 지방세포 내로 유입시켜 혈중 내의 농도를 낮추고, 근육에서 지방산의 이용을 감소시켜 인슐린 저항성 감소를 유발시킨다³⁶⁾.

PPAR α 는 신장, 심장, 골격근과 갈색지방조직 등 대사적 활성을 보이는 여러 조직에서 발현되며, 특히 간과 근육에서 지방산 산화를 통해 에너지 저장을 줄이는 기능을 맡고 있으며³⁷⁾, 많은 연구에서 지방 또는 근육 조직에서 이들 단백질의 발현도를 비교하고 있다^{33,34)}. 본 연구에서는 고지방식이로 유도된 비만 흰쥐의 뇌 시상하부조직에서 지방산 대사와 관련되는 PPARs의 활성을 측정하였는데, 차전자와 복령의 복합 물추출물 경구투여는 고지방식이 공급에 따른 PPAR γ 의 발현을 현저히 증가시켰고, PPAR α 의 발현은 억제시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는, CJB 경구투여 후 시상하부 PPAR α 와 γ 의 단백질 변화는 AMPK 단백질 발현 결과와 유사한 한편 제시하지 않은 근육의 데이터와는 다르게 나타났다. 이 PPAR γ 의 증가결과는 지질대사에 대한 기전과는 별도로 양성 에너지 균형 조절과 인슐린 감수성을 증가시키며, PPAR α 의 억제결과는 에너지 항상성 유지를 위해 FAS

(fatty acid synthase) 활성 저해와 더불어 leptin 비의존적으로 식욕을 감소시키고 체중감소를 촉진시켜 항 비만효과를 나타내는 것으로 사료되어 진다. NPY는 36개의 아미노산으로 구성된 단백질로 식이섭취와 에너지 균형 조절에 관여하는 중추신경계 신경전달물질 중 하나로서 NPY 활성이 식이섭취량을 증가시키고, NPY 억제 시 식이섭취량이 감소한다고 보고되었다³⁸⁻⁴⁰⁾. 본 연구에서 정상식이를 급여한 Normal군에 비해 고지방식이 투여군인 HF 군에서 NPY 활성이 유의적으로 증가하였으며, 이는 CJB 경구투여에 의해 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 CJB 경구투여가 에너지 항상성에 있어서 뇌 시상하부의 방실행의 식욕유도 물질인 NPY에 의해 증대되는 중추신경계의 식이섭취 조절기전에 영향을 줌으로써, 고지방식이 유도 비만쥐의 체중감소, 식이섭취량 및 섭취한 에너지의 감소를 유도한 것으로 보여진다. LR은 지방세포에서 특이적으로 분비되는 호르몬인 렙틴(leptin)의 수용체로서⁴¹⁾ 중추신경계 시상하부를 통해 에너지 소비를 조절함으로써 체지방조직 내 지방축적을 조절하는 호르몬이므로 렙틴 수용체의 발현 변화는 지방 조직으로부터 유래되는 leptin과 더불어 비만지표로도 사용된다⁴²⁾. 본 실험에서 고지방식이군에서 렙틴 수용체발현의 유의적 증가를 나타내었으며, CJB를 경구투여함으로써 실험군에서는 그발현이 감소되었다. 따라서, CJB 경구투여가 비만 흰쥐에서 지방세포로부터 분비되는 혈액 내 렙틴의 분비를 억제시킬 수 있으며, 이는 렙틴과 반응하는 뇌 시상하부 ARC의 렙틴수용체 발현을 감소시킴으로써 고지방식이 비만 흰쥐의 체지방량 조절기전에 조절을 통해 체지방량을 감소시키는 것으로 여겨진다.

이상의 모든 실험 결과로부터, CJB는 고지방식이로 유발된 비만 흰쥐에서 체지방 감소를 통해 체중 감소와, 혈중 지방대사 개선효과를 나타내었다. 이와 같은 항 비만효과는 중추신경계의 시상하부의 식이섭취 및 지방대사 조절 기전인 NPY와 LR 발현조절을 통해 이루어짐을 확인하였다. 또한, 차전자와 복령의 주요성분인 수용성 섬유소의 기능뿐만 아니라 지질 대사 관련 기전을 통해서도 항비만 효과가 나타나는 것으로 사료되어진다. 이에 대한 보다 정확한 작용기전은 향후 더 많은 연구가 필요하다.

결론

본 연구에서는 차전자와 복령의 복합 물추출물(CJB)이 고지방식이로 유발된 비만 흰쥐에서 체중증가의 감소 및 지방대사에 대한 개선효과를 지방조직, 혈액 그리고 뇌 시상하부 조직에서 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

8주간 고지방식이 공급으로 비만이 유발된 흰쥐에 CJB 경구투여한 결과

1. CJB 경구투여는 고지방식이 공급에 따른 체중, 식이섭취량, 지방조직 무게 증가를 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰다.
2. CJB 경구투여는 대조군에 비해 혈액내 중성지방과 총 콜레스테롤 함량을 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰다.

3. CJB 경구투여는 대조군에 비해 혈중 HDL-콜레스테롤 농도를 증가시켰고, LDL-콜레스테롤 농도를 감소시켰다.
4. 고지방식이 유도비만쥐의 뇌 시상하부 조직에서의 Western bolt 분석 결과, CJB 경구투여는 뇌 시상하부에서 실험대조군에 비해 AMPK 인산화를 감소시켰고 ACC수준을 감소시켰다. PPAR γ 의 발현은 증가시키고, PPAR α 의 발현은 감소시켰다.
5. 면역조직화학법을 이용한 분석 결과, CJB의 경구투여로 뇌 시상하부 조직에서의 NPY와 LR 발현이 실험 대조군에 비해 감소하였다.

이상의 결과를 종합하여보면 CJB는 고지방식이 유도 비만 흰쥐에서 및 뇌 시상하부 조절을 통한 식욕 억제 및 지방대사 조절로 체중감소와 더불어 지방대사 개선 항비만 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 CJB의 항비만 효과는 비만 예방과 치료에 매우 유효할 것으로 기대되며 항비만 치료를 위한 새로운 처방으로서, 나아가 관련 제품의 소재로도 활용될 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. World Health Organization(WHO). Obesity and overweight in Media centre, 2011.
2. Ministry of health and Welfare & Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2010 national nutrition survey the fifth. Emerg Infect Dis [serial online] 2011 Nov 14 [cited 2011 Nov 28] ; 5(1) : Available from : URL : <http://knhanes.cdc.go.kr>
3. National Health Insurance Corporation, 2008 : Available from : URL : <http://www.nhic.or.kr>
4. You SJ. Pharmacological Treatment of Obesity. J Korean Endocr Soc. 2008 ; 23(4) : 223-33.
5. Kwon DH, Lee MJ, Lim CY, Shambhunath B, Lee SJ, Kim HJ. Efficacy of Red Ginseng by Oriental Medical Obesity Syndrome Differentiation on Obese women : Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. J Soc Kor Med Obe Res. 2011 ; 11(1) : 1-14.
6. Jeong SH, Lee KT, Ann HS, Lee JY, Choi JW, Kim DG. Hypolipidemic and Antioxidative Effects of Bangpoongtong- sungankamibang on Diet-Induced Obesity Rats. Kor J Pharmacogn. 2006 ; 37(3) : 190-5.
7. Seo BI, Lee JH, Cho HY, Kwon DR, Bu YM. Hanyakbonchohak. Younglimsa, 2006 : 413-5.
8. Moreno LA, Tresaco B, Bueno G, Fleta J, Rodriguez G, Garagorri JM, Bueno M. Psyllium fibre and the metabolic control of obese children and adolescents. J Physiol Biochem. 2003 ; 59(3) : 235-42.
9. Frati-Munari AC, Fernandez-Harp JA, Becerril M, Chavez-Negrete A, Banales-Ham M. Decrease in serum lipids, glycemia and body weight by *Plantago psyllium* in obese and diabetic patients. Arch Invest Med. 1983 ; 14(3) : 259-68.
10. Enzi G, Inelmen EM, Crepaldi G. Effect of a hydrophilic mucilage in the treatment of obese patients. Pharmatherapeutica. 1980 ; 2(7) : 421-8.
11. Sato M, Tai T, Nunoura Y, Yajima Y, Kawashima S, Tanaka K. Dehydro- trametenolic acid induces preadipocyte differentiation and sensitizes animal models of noninsulin-dependent diabetes mellitus to insulin. Biol Pharm Bull. 2000 ; 25(1) : 81-6.
12. Kaminage T, Yasukawa K, Kanno H, Tai T, Nunoura Y, Takido M. Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of *Poria cocos*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Oncology. 1996 ; 53(5) : 382-5.
13. Nukaya H, Yamashiro H, Fukazawa H, Ishida H, Tsuji K. Isolation of inhibitors of TPA-induced mouse ear edema from *Hoelen*, *Poria cocos*. Tokyo : Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1996 ; 44(4) : 847-9.
14. Kang BG, Mun JS, Choi SM. A reliability analysis of syndrome differentiation questionnaire for obesity. Kor J Ori Med. 2007 ; 13(1) : 109-14.
15. Seo BI, Jung KY. Bonchohak, daegu haany university a publishing department, 2004 : 181-2.
16. Seo BI, Jung KY. Bonchohak, daegu haany university a publishing department, 2004 : 190-1.
17. Yoo SJ. Pharmacological treatment of obesity. J Kor Soc Endocrinol. 2008 ; 23(4) : 223-33.
18. Tominaga S, Nishi K, Nishimoto S, Akiyama K, Yamauchi S, Sugahara T. (-)-Secoisolariciresinol attenuates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice. Food Funct. 2012 ; 3(1) : 76-82.
19. Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP. The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. JAMA. 1999 ; 282(16) : 1519-22.
20. Davignon J, Cohn JS. Triglyceride: a risk factor for coronary heart disease. Atherosclerosis. 1996 ; 124 : S57-64.
21. Anderson JW, Allgood LD, Turner J, Oeltgen PR, Daggy BP. Effects of psyllium on glucose and serum lipid responses in men with type 2 diabetes and hypercholesterolemia. Am J Clin Nutr. 1999 ; 70(4) : 466-73.
22. Anderson JW, Allgood LD, Lawrence A, Altringer

- LA, Jerdack GR, Hengehold DA, Morel JG. Cholesterol-lowering effects of psyllium intake adjunctive to diet therapy in men and women with hypercholesterolemia: meta-analysis of 8 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2000 ; 71(2) : 472-9.
23. Lipsky H, Gloger M, Frishman WH. Dietary fiber for reducing blood cholesterol. *Journal of Clinical Pharmacology.* 1990 ; 30(8) : 699-703.
24. Chandalia M, Garg A, Lutjohann D, von Bergmann K, Grundy SM, Brinkley LJ. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2000 ; 342(19) : 1392-8.
25. Morgan B, Heald M, Atkin SD, Green J, Chain EB. Dietary fiber and sterol-metabolism in the rat. *Br J Nutr.* 1974 ; 32(2) : 447-55.
26. Ghee SS, Lee YJ. The therapeutic effects of Bangkeehwangkee-tang and Bangkeeboryeong-tang on the hyper-lipidemia in rats. *Kor J Herbology.* 2005 ; 20(2) : 149-57.
27. Nammi S, Sreemantula S, Roufogalis BD. Protective effects of ethanolic extract of *Zingiber officinale* rhizome on the development of metabolic syndrome in high-fat diet-fed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009 ; 104(5) : 366-73.
28. Kola B, Grossman AB, Korbonits M. The role of AMP-activated protein kinase in obesity. *Front Horm Res.* 2008 ; 36 : 198-211.
29. Yano W, Kubota N, Itoh S, Kubota T, Awazawa M, Moroi M, Sugi K, Takamoto I, Ogata H, Tokuyama K, Noda T, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin-knockout mice. *Endocr J.* 2008 ; 55(3) : 515-22.
30. Janovska A, Hatzinikolas G, Staikopoulos V, McInerney J, Mano M, Wittert GA. AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 ; 284(1-2) : 1-10.
31. Pang J, Choi Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch Biochem Biophys.* 2008 ; 476(2) : 178-85.
32. Landree LE, Hanlon AL, Strong DW, Rumbaugh G, Miller IM, Thupari JN, Connolly EC, Haganir RL, Richardson C, Witters LA, Kuhajda FP, Ronnett GV. C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(5) : 3817-27.
33. Schwartz MW, Porte D Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science.* 2005 ; 307(5708) : 375-9.
34. Shin SS, Park D, Lee HY, Hong Y, Choi J, Oh J, Lee H, Lee HR, Kim MR, Shen ZB, Cui HH, Yoon M. The herbal composition GGEx18 from *Laminaria japonica*, *Rheum palmatum*, and *Ephedra sinica* reduces obesity via skeletal muscle AMPK and PPAR α . *Pharm Biol.* 2012 ; 50(4) : 506-15.
35. Guo L, Tabrizchi R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacol Ther.* 2006 ; 111(1) : 145-73.
36. Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic disease, and peroxisome proliferator-activated receptor. *Endocrinology.* 2003 ; 144(16) : 2201-7.
37. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.* 2004 ; 10(4) : 355-61.
38. Hanson ES, Dallman MF. Neuropeptide Y (NPY) may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol.* 1995 ; 7(4) : 273-9.
39. White BD, Dean RG, Edwards GL, Martin RJ. Type II corticosteroid receptor stimulation increases NPY gene expression in basomedial hypothalamus of rats. *Am J Physiol.* 1994 ; 266(5 Pt 2) : R1523-9.
40. Kim SO, Yun SJ, Lee EH. The water extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) exhibits anti-obesity effects through neuroendocrine modulation. *Am J Chin Med.* 2007 ; 35(2) : 297-308.
41. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995 ; 83(7) : 1263-71.
42. Winick JD, Stoffel M, Friedman JM. Identification of microsatellite markers linked to the human leptin receptor gene on chromosome 1. *Genomics.* 1996 ; 36(1) : 221-2.